

## Interference microscope and method for operating an interference microscope

Patent Number: EP1223451  
 Publication date: 2002-07-17  
 Inventor(s): GUGEL HILMAR (DE); BEWERSDORF JOERG (DE)  
 Applicant(s): LEICA MICROSYS HEIDELBERG GMBH (DE)  
 Requested Patent: DE10100247  
 Application Number: EP20010000738 20011211  
 Priority Number(s): DE20011000247 20010105  
 IPC Classification: G02B21/06; G02B21/00  
 EC Classification: G02B21/06  
 Equivalents: JP2002221668, US2002105722  
 Cited Documents:

### Abstract

The present invention concerns an interference microscope and a method for operating an interference microscope, in particular a 4p microscope, standing wave field microscope, or  $I<2>M$ ,  $I<3>M$ , or  $I<5>M$  microscope, at least one specimen support unit (22) associated with the specimen being provided. For determination of the phase position of the interfering light in the specimen region, on the basis of which the interference microscope can be aligned, the interference microscope is characterized in that for determination of the illumination state in the specimen region of the interference microscope, at least one planar area - preferably a surface (29) - of the specimen support unit (22) is configured to be detectable by light microscopy.



Data supplied from the esp@cenet database - I2

### Description

[0001] The present invention concerns an interference microscope and a method for operating an interference microscope. A 4p microscope, standing wave field microscope, or IM, IM, or IM microscope is provided, in particular, as the interference microscope. At least one specimen support unit is associated with the specimen.

[0002] Interference microscopes of the species are known from practical use. EP 0 491 289 A1, for example, discloses a double-confocal scanning microscope or 4p microscope in which a specimen is illuminated in point-like fashion by two microscope objectives arranged opposite one another. As a result of this double-sided illumination of the specimen and/or the double-sided detection of the light coming from the specimen, an interference pattern is created with which an increase in axial resolution can be achieved.

[0003] US Patent 4,621,911 discloses a standing wave field microscope in which a standing wave field or interference pattern serving to illuminate a specimen is formed by the superposition of two light beams proceeding in collimated fashion. This standing wave field has planes of equal illumination intensity oriented parallel to the focal plane of the microscope objectives, the illumination intensity varying from a maximum illumination intensity value to a minimum illumination intensity value, and the alternating illumination variation being continued periodically along the optical axis of the microscope objectives. With this interferometric illumination method, fluorescent specimens can be excited to fluoresce in accordance with the illumination pattern, thereby also allowing an axial resolution improvement to be achieved.



①9 **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Off nl gungsschrift**  
⑩ **DE 101 00 247 A 1**

⑤1 Int. Cl.7:  
**G 02 B 21/06**  
G 02 B 21/16  
G 02 B 21/34  
G 01 B 9/04

②1 Aktenzeichen: 101 00 247.5  
②2 Anmeldetag: 5. 1. 2001  
④3 Offenlegungstag: 11. 7. 2002

**DE 101 00 247 A 1**

⑦1 Anmelder:  
Leica Microsystems Heidelberg GmbH, 68165  
Mannheim, DE

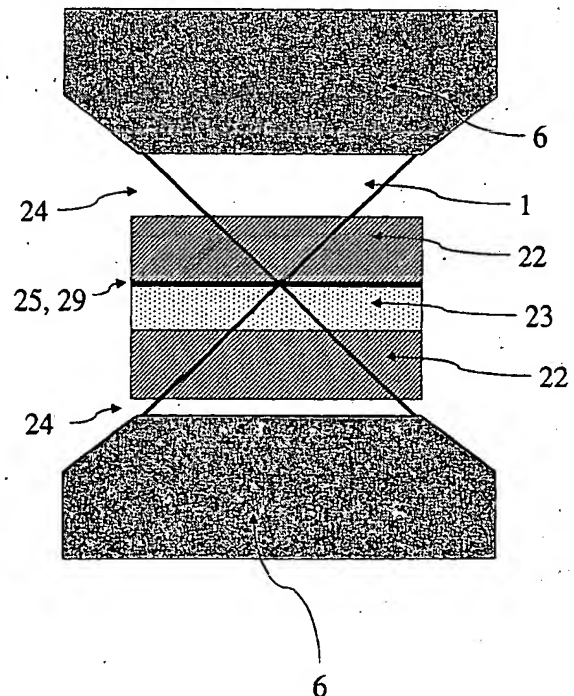
⑦4 Vertreter:  
Ullrich & Naumann, 69115 Heidelberg

⑦2 Erfinder:  
Bewersdorf, Jörg, 69121 Heidelberg, DE; Gugel,  
Hilmar, 69121 Heidelberg, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤4 Interferenzmikroskop und Verfahren zum Betrieb eines Interferenzmikroskops

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Interferenzmikroskop und ein Verfahren zum Betrieb eines Interferenzmikroskops, insbesondere eines 4Pi-, Wellenfeld-, I<sup>2</sup>M-, I<sup>3</sup>M- oder I<sup>PM</sup>-Mikroskops, wobei mindestens eine dem Objekt zugeordnete Objektträgerereinheit (22) vorgesehen ist. Zur Bestimmung der Phasenlage des interferierenden Lichts im Objektbereich, anhand derer das Interferenzmikroskop justiert werden kann, ist das Interferenzmikroskop dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereich des Interferenzmikroskops mindestens eine Fläche - vorzugsweise eine Oberfläche (29) - der Objektträgerereinheit (22) lichtmikroskopisch detektierbar ausgestaltet ist.



**DE 101 00 247 A 1**

## Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Interferenzmikroskop und ein Verfahren zum Betrieb eines Interferenzmikroskops. Insbesondere ist als Interferenzmikroskop ein 4Pi-, Wellenfeld-, I<sup>2</sup>M-, I<sup>3</sup>M- oder I<sup>5</sup>M-Mikroskop vorgesehen. Dem Objekt ist mindestens eine Objektträgerereinheit zugeordnet.

[0002] Gattungsbildende Interferenzmikroskope sind aus der Praxis bekannt. Aus der EP 0 491 289 A1 ist beispielsweise ein doppelkonfokales Rasternmikroskop bzw. ein 4Pi-Mikroskop bekannt, bei dem ein Objekt von zwei einander entgegengesetzt angeordneten Mikroskopobjektiven punktförmig beleuchtet wird. Durch diese beidseitige Beleuchtung des Objekts und/oder durch die beidseitige Detektion des vom Objekt kommenden Lichts bildet sich ein Interferenzmuster aus, mit Hilfe dessen eine Erhöhung des axialen Auflösungsvermögens erzielt werden kann.

[0003] Aus der US 4,621,911 ist ein Wellenfeldmikroskop bekannt, bei dem durch Überlagerung zweier kollimiert verlaufender Lichtstrahlen ein zur Beleuchtung eines Objekts dienendes Wellenfeld bzw. Interferenzmuster ausgebildet wird. Dieses Wellenfeld weist parallel zur Fokalebene der Mikroskopobjektive ausgerichtete Ebenen gleicher Beleuchtungsintensität auf, wobei die Beleuchtungsintensität von einem maximalen Beleuchtungsintensitätswert zu einem minimalen Beleuchtungsintensitätswert variiert, wobei die alternierende Beleuchtungsvariation periodisch entlang der optischen Achse der Mikroskopobjektive fortgesetzt ist. Mit diesem interferometrischen Beleuchtungsverfahren können Fluoreszenzobjekte entsprechend dem Beleuchtungsmuster zur Fluoreszenz angeregt werden, wodurch ebenfalls eine axiale Auflösungsverbesserung erzielbar ist.

[0004] Aus der US 5,671,085 ist ein I<sup>2</sup>M-, I<sup>3</sup>M- oder I<sup>5</sup>M-Mikroskop bekannt, bei dem ebenfalls ein Objekt über zwei einander entgegengesetzt angeordneten Mikroskopobjektiven mit einer Hellfeld-Auflicht-Beleuchtung zur Fluoreszenz angeregt wird. Auch hierbei kann das Beleuchtungs- und/oder das Detektionslicht zur Interferenz gebracht werden, wodurch ebenfalls axiale Auflösungsverbesserungen erzielt werden können.

[0005] Interferenzmikroskope weisen ganz allgemein einen Beleuchtungsstrahlengang mindestens einer Lichtquelle sowie einen Detektionsstrahlengang mindestens eines Detektors auf. Bei den oben genannten Interferenzmikroskopen sind zwei Objektive beidseits der Objektebene angeordnet, wobei die Objektive gegeneinander gerichtet sind. Im Beleuchtungs-/Detektionsstrahlengang ist mindestens ein Strahlteiler zur Aufteilung des Beleuchtungslichts auf die Objektive und ein Strahlvereiniger zur Zusammenführung des von den Objektiven kommenden Detektionslichts vorgesehen. Der Strahlteiler und der Strahlvereiniger könnte als ein und dasselbe Bauteil ausgeführt sein. Üblicherweise werden mit Fluoreszenzmarkern spezifisch gefärbte Objekte, insbesondere biologische Objekte, mit den oben genannten Interferenzmikroskopen untersucht. Hierbei wird das Licht der Lichtquelle zur Anregung der Fluoreszenzmarker verwendet und lediglich dieses Fluoreszenzlicht wird von dem Detektor detektiert.

[0006] Die Interferenzmikroskope der gattungsbildenden Art sind aufgrund ihres interferometrischen Aufbaus sowie der kleinen Ausmaße des Objektiv-Fokusses sehr anfällig gegenüber Erschütterungen, Schwingungen und thermischen Ausdehnungen. Insbesondere der Abgleich der optischen Weglängenunterschiede zwischen den Interferometerstrahlengängen ist eine entscheidende Einflussgröße für den erfolgreichen Betrieb eines Interferenzmikroskops. Hierbei müssen die optischen Weglängenunterschiede so

gering sein, dass zum einen das die beiden Interferometerstrahlengänge durchlaufende Beleuchtungslicht interferieren kann, d. h. der optische Weglängenunterschied der beiden Interferometerstrahlengänge muss geringer als die Kohärenzlänge des Beleuchtungslichts sein. Zum anderen muss der optische Weglängenunterschied der beiden Interferometerstrahlengänge derart aufeinander abgeglichen sein, dass im Objektbereich des Interferenzmikroskops konstruktive Interferenz vorliegt.

[0007] Die Justage der Interferenzstrahlengänge wird in der Praxis bei den bisher realisierten Interferenzmikroskopen anhand von Detektionen einzelner Objektbereiche durchgeführt. So wird beispielsweise ein axialer optischer Schnitt durch ein punkt- oder linienförmiges Objekt aufgenommen, anhand dessen Intensitätssignalverlaufs die Justage des Interferenzmikroskops durchgeführt wird. An dem axialen Intensitätssignalverlauf können Rückschlüsse auf den tatsächlich vorliegenden Beleuchtungszustand im Objektbereich gezogen werden, ob also beispielsweise konstruktive oder destruktive Interferenz vorliegt. Diese Justage ist aufwendig und muss von dem Bediener des Interferenzmikroskops individuell durchgeführt werden. Darüber hinaus sind zur erfolgreichen Justage hohe Erfahrungswerte des Bedieners unabdingbar, letztendlich ist die Verwendung von Interferenzmikroskopen der gattungsbildenden Art nur einem kleinen Bedienerkreis möglich, was bislang eine weite Verbreitung der in Rede stehenden Interferenzmikroskope verhindert hat.

[0008] Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Interferenzmikroskop der gattungsbildenden Art und ein Verfahren zum Betrieb eines solchen Interferenzmikroskops anzugeben und weiterzuentwickeln, mit dem eine Bestimmung der Phasenlage des interferierenden Lichts im Objektbereich möglich ist, anhand derer das Interferenzmikroskop justiert werden kann.

[0009] Das erfindungsgemäße Interferenzmikroskop löst die voranstehende Aufgabe durch die Merkmale des Patentanspruchs 1. Danach ist ein solches Interferenzmikroskop dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereich des Interferenzmikroskops mindestens eine Fläche – vorzugsweise eine Oberfläche – der Objektträgerereinheit lichtmikroskopisch detektierbar ausgestaltet ist.

[0010] Erfindungsgemäß ist zunächst erkannt worden, dass auf die Detektion einzelner Objektbereiche zur Bestimmung der Phasenlage verzichtet werden kann, wenn als Referenzobjekt mindestens eine geeignet ausgestaltete Fläche der Objektträgerereinheit verwendet wird. Hierdurch wird insbesondere bei der Detektion von Fluoreszenzobjekten das zu detektierende Fluoreszenzobjekt geschont, da die erforderlichen Messungen zur Detektion der Phasenlage des interferierenden Lichts an der Fläche der Objektträgerereinheit durchgeführt werden kann. Somit kann ein Ausbleichen des Fluoreszenzobjekts lediglich zu Zwecken der Phasenbestimmung vermieden werden, da die Messung zur Bestimmung der Phasenlage des interferierenden Lichts in einem Bereich der Fläche der Objektträgerereinheit durchgeführt werden kann, der von dem Objekt hinreichend weit entfernt ist, so dass das Objekt nicht oder zumindest kaum zur Fluoreszenz angeregt wird. Auch wäre eine Referenzmessung an einer Fläche der Objektträgerereinheit mit Licht einer Wellenlänge denkbar, die nicht zur Anregung der Fluoreszenzmarker geeignet ist, die allerdings auch kein kontrastreicheres Meßsignal des Objekts liefern würde, da das Objekt im Allgemeinen nur schwach absorbierend ist.

[0011] In erfindungsgemäßer Weise ist daher die Fläche der Objektträgerereinheit lichtmikroskopisch detektierbar ausgestaltet. Insbesondere ist hierzu eine Fläche der Objekt-

trägereinheit derart ausgestaltet bzw. präpariert, dass an dieser Fläche Licht reflektierbar oder induzierbar ist.

[0012] Eine lichtmikroskopisch detektierbar ausgestaltete Fläche der Objekträgerereinheit könnte durch eine zumindest teilweise reflektierende Beschichtung einer Oberfläche der Objekträgerereinheit realisiert werden, beispielsweise in Form eines einseitig beschichteten Deckglases. Alternativ hierzu könnte die Objekträgerereinheit eine reflektierende oder lumineszierende Schicht zwischen zwei Glasplatten aufweisen, so dass durch diese Schicht eine lichtmikroskopisch detektierbar ausgestaltete Fläche gegeben ist. Auch könnten zwei, in direktem Kontakt zueinander stehende Glasplatten unterschiedlicher Materialeigenschaften eine lichtmikroskopisch detektierbar ausgestaltete Fläche bilden, wenn sich beispielsweise die Brechungsindizes der beiden Glasplatten unterscheiden, wobei durch den Brechungsindexübergang die Fläche lichtmikroskopisch detektierbar ist. Weiterhin kann der Einsatz von Kristall- oder Glasplättchen mit holographischen Beschichtungen bzw. Ausbildungen in einer lichtmikroskopisch detektierbar ausgestaltete Fläche resultieren. Alternativ hierzu könnte eine Oberfläche der Objekträgerereinheit mit einer Fluoreszenzschicht beschichtet sein, so dass an dieser Oberfläche Fluoreszenzlicht induzierbar ist. Obwohl eine Fläche üblicherweise eine zweidimensionale Ausdehnung aufweist, ist in diesem Zusammenhang unter einer Fläche durchaus auch eine Schicht oder ein Objekt mit einer dreidimensionalen Ausdehnung zu verstehen, wenn auch nur mit einer geringen räumlichen Ausdehnung in einer Dimension.

[0013] Eine Kombination dieser Möglichkeiten ist ebenfalls denkbar, in diesem Fall könnte sowohl eine reflektierende als auch eine fluoreszierende Schicht vorgesehen sein, so dass die Fluoreszenzschicht durch das Beleuchtungslicht zur Fluoreszenz angeregt wird – d. h. Fluoreszenzlicht induziert wird – sowie das Beleuchtungslicht von der reflektierenden Schicht reflektiert wird.

[0014] Dieses induzierte und/oder reflektierte Licht wird von einem Detektor detektiert. Anhand der Detektionssignale kann dann auf die Phasenlage direkt im Objektbereich des Interferenzmikroskops geschlossen werden, wodurch das Interferenzmikroskop entsprechend justiert werden kann. In besonders vorteilhafter Weise ermöglicht diese Vorgehensweise der Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereich des Interferenzmikroskops eine reproduzierbare und zugleich objektive Messung, da das Ergebnis dieser Messung lediglich von der definiert präparierten Oberfläche bzw. von den definierten Eigenschaften der Fläche abhängt und nicht an dem zu messenden Objekt durchgeführt werden muss. Diese Vorgehensweise führt weiterhin zwangsläufig zu einem reproduzierbaren Ergebnis, was bei der aus dem Stand der Technik bekannten Vorgehensweise – der Beleuchtungszustand im Objektbereich wird am Objekt selbst detektiert – nicht immer möglich ist, da beispielsweise das Objekt keine geeigneten Strukturen aufweisen könnte, anhand dessen Rückschlüsse auf die tatsächlich vorliegende Phasenlage des Beleuchtungslichts geschlossen werden kann.

[0015] Mindestens eine Fläche der Objekträgerereinheit könnte teilweise reflektierend ausgeführt sein. Hierzu könnte die Oberfläche beschichtet sein. Insbesondere könnte die Oberfläche derart beschichtet sein, dass sie einen definierten Reflexionsgrad aufweist, der vorzugsweise über die gesamte Oberfläche konstant ist. Die Beschichtung der Oberfläche könnte wellenlängenabhängig sein, so dass beispielsweise nur Licht einer bestimmten Wellenlänge an der Oberflächenbeschichtung reflektiert wird. In bevorzugter Weise ist die Beschichtung derart ausgeführt, dass Licht unterschiedlicher Wellenlängen reflektiert wird. Als Oberflä-

chenbeschichtung ist eine metallische oder eine dielektrische Beschichtung vorgesehen, eine dielektrische oder metallisch-dielektrische Hybridbeschichtung wäre ebenfalls denkbar.

[0016] In weiter vorteilhafter Weise weist mindestens eine Oberfläche der Objekträgerereinheit mindestens eine zur Lumineszenz, insbesondere Fluoreszenz, anregbare Schicht auf. Bei dieser Lumineszenzschicht könnte es sich um eine Monolayer-Schicht handeln. Monolayer-Schichten weisen eine definierte Dicke auf, die durch die Dimension der verwendeten Lumineszenzmoleküle sowie deren Anordnung auf der Oberfläche gegeben ist. Somit stellt eine Monolayer-Schicht eine ideale zur Lumineszenz geeignete flächenförmige Struktur dar.

[0017] In besonders vorteilhafter Weise ist die Oberfläche der Objekträgerereinheit mit mehreren Lumineszenzschichten versehen, die jeweils unterschiedliche Lumineszenzeigenschaften aufweisen. Diese Lumineszenzschichten können durch Licht unterschiedlicher Wellenlängen selektiv zur Lumineszenz angeregt werden und das von den Lumineszenzschichten emittierte und sich in seiner Wellenlänge ebenfalls unterscheidende Lumineszenzlicht kann selektiv detektiert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform sind als Oberflächenbeschichtung mehrere zur Lumineszenz anregbare Monolayer-Schichten unterschiedlicher Lumineszenzeigenschaften vorgesehen. Die Lumineszenzschicht bzw. die Lumineszenzschichten sind mit Licht einer Lichtquelle zur Lumineszenz anregbar. Hierbei könnte es sich um die Lichtquelle des Interferenzmikroskops handeln, der Einsatz einer zusätzlichen Lichtquelle, die lediglich die Lumineszenzschicht zur Lumineszenz anregt, ist ebenfalls denkbar. Idealerweise emittiert die Lichtquelle Licht unterschiedlicher Wellenlängen, so dass eine mit mehreren unterschiedlichen Lumineszenzschichten beschichtete Oberfläche mit Licht dieser einen Lichtquelle zur Lumineszenz anregbar sind. Im Konkreten könnte es sich um einen Argon-Krypton-Laser handeln, der Licht der Wellenlängen 488 nm, 568 nm und 647 nm simultan emittiert. Der Einsatz einer HBO-Lampe ist ebenfalls möglich, auch mit diesem Licht unterschiedlicher Wellenlängen können unterschiedliche Lumineszenzschichten zur Lumineszenz angeregt werden.

[0018] In einer alternativen Ausführungsform ist vorgesehen, dass an einer Fläche der Objekträgerereinheit Licht mit Hilfe nicht-linearer Prozesse induziert wird. Insbesondere ist als nicht-linearer Prozess CARS (Coherent-Anti-Stokes-Raman-Scattering) vorgesehen. Bei CARS handelt es sich um einen Vier-Wellen-Mischprozess, der proportional zum Quadrat der Intensität des verwendeten Lichts ist. CARS tritt nur an Orten auf, an denen eine optische Asymmetrie vorliegt, so beispielsweise ein Brechungsindexsprung, der an der Oberfläche der Objekträgerereinheit gegeben ist, da hierbei ein Brechungsindexübergang von Glas zu dem das Objekt umgebende Immersionsmedium vorliegt.

[0019] In einer bevorzugten Ausführungsform wird das an der Fläche reflektierte und/oder induzierte Licht mit dem Detektor des Interferenzmikroskops detektiert. Dies ist insbesondere dann vorteilhaft, wenn das an der Fläche reflektierte/induzierte Licht ungefähr im gleichen Leistungsbereich sowie Wellenlängenbereich wie das vom Objekt zu detektierende Licht liegt und an den Detektionsbereich des Detektors des Interferenzmikroskops angepasst ist. Es ist jedoch auch denkbar, dass das an der Fläche reflektierte/induzierte Licht mit einem zusätzlichen Detektor detektierbar ist. Hierzu wird das reflektierte/induzierte Licht mit Hilfe mindestens eines optischen Bauteils aus dem Detektions- oder Beleuchtungsstrahlengang des Interferenzmikroskops ausgeblendet und dem zusätzlichen Detektor zugeleitet. Hierzu könnte als optisches Bauteil eine herkömmliche

Glasplatte mit einem definierten Reflexions-/Transmissionsgrad sein. Ein dichroitischer Strahlteiler, ein Filter, ein Prisma, ein Gitter und/oder eine spektral empfindliche Anordnung wäre als optisches Bauteil zum Ausblenden des reflektierten/induzierten Lichts ebenfalls denkbar. Insbesondere wenn es sich bei dem an der Fläche der Objektträger-einheit induzierten Licht um Fluoreszenzlicht einer Fluoreszenzschicht handelt, kann mit einer spektral empfindlichen Anordnung dieses Fluoreszenzlicht spektral selektiv dem Detektor zugeleitet werden. Die spektral empfindliche Anordnung könnte beispielsweise Linsen, Blenden sowie ein Prisma oder ein Gitter aufweisen.

[0020] Die Detektion des an der Fläche der Objektträger-einheit reflektierten und/oder induzierten Lichts könnte im Widefield-Modus erfolgen. Bei dem Widefield-Modus handelt es sich um eine flächenhafte Beleuchtung und/oder Detektion, wie sie beispielsweise bei einem Wellenfeldmikroskop oder einem PM-Mikroskop vorliegt. Dementsprechend könnte der das an der Fläche reflektierte/induzierte Licht detektierende Detektor als flächenförmiger Detektor ausgeführt sein, beispielsweise in Form eines CCD-Chips.

[0021] Das an der Fläche der Objektträger-einheit reflektierte und/oder induzierte Licht könnte konfokal detektiert werden. In diesem Fall ist eine konfokale Beleuchtung vorgesehen, d. h., das zur Beleuchtung dienende Licht wird auf einen Punkt der Fokalebene des Mikroskopobjektivs fokussiert. Zur konfokalen Detektion ist dem Detektor eine Lochblende vorgeordnet, die vorzugsweise in einer zur Objektebene des Objektivs korrespondierenden Ebene angeordnet ist. Als Lochblende könnte die Beleuchtungs- oder Detektionslochblende des Interferenzmikroskops vorgesehen sein. Wenn das an der Fläche der Objektträger-einheit reflektierte/induzierte Licht mit dem konfokalen Detektor des Interferenzmikroskops erfolgt, ist die dem Detektor vorgeordnete Lochblende die Detektionslochblende des Interferenzmikroskops. Falls als Lochblende das Beleuchtungspinhole dient, könnte ein zwischen der Lichtquelle und dem Beleuchtungspinhole angeordnetes optisches Bauteil das an der Fläche der Objektträger-einheit reflektierte/induzierte Licht aus dem Beleuchtungsstrahlengang ausblenden und einem entsprechend angeordneten Detektor zuführen.

[0022] In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, dass die Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereich des Interferenzmikroskops mit Licht mindestens einer zusätzlichen Lichtquelle durchgeführt wird. Hierbei kann es sich wie bereits erwähnt um ein Lasersystem, einen Laser oder eine HBO-Lampe handeln.

[0023] In einer konkreten Ausführungsform ist die Objektträger-einheit aus Glas angefertigt. Die Oberflächen der Objektträger-einheit weist idealerweise eine hohe Oberflächenplanität auf, die auch die ggf. auf einer Oberfläche aufgetragene Beschichtung bzw. Fluoreszenzschicht aufweist. Im Konkreten könnte die Objektträger-einheit als Deckglas ausgeführt sein. Hierbei könnte es sich um kommerziell erhältliche Deckgläser handeln. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Objekt zwischen zwei Objektträger-einheiten angeordnet, vorzugsweise zwischen zwei als Deckgläser ausgestaltete Objektträger-einheiten. Vorzugsweise wird die Fläche der Objektträger-einheit reflektierbar oder induzierbar ausgestaltet, die dem Objekt zugewandt ist.

[0024] In verfahrensmäßiger Hinsicht wird die eingangs genannte Aufgabe durch die Merkmale des nebengeordneten Patenanspruchs 28 gelöst. Danach ist ein solches Verfahren zum Betrieb eines Interferenzmikroskops dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungszustand im Objektbereich des Interferenzmikroskops anhand mindestens einer lichtmikroskopisch detektierbar ausgestalteten Fläche – vorzugsweise einer Oberfläche – der Objektträger-einheit be-

stimmt wird. Bei dem Interferenzmikroskop handelt es sich vorzugsweise um ein Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 27.

[0025] Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren ist vorgesehen, dass die Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereich des Interferenzmikroskops anhand mindestens einer lichtmikroskopisch detektierbar ausgestalteten Fläche erfolgt. Insbesondere wird das an der Fläche reflektierte und/oder induzierte Licht detektiert. Hierzu wird ein Intensitätssignalverlauf in Abhängigkeit der axialen Position der Fläche detektiert. Zur Detektion des axialen Intensitätssignalverlaufs wird das Objekt samt Objektträger-einheit entlang der optischen Achse des Objektivs bzw. der Objektive bewegt und das von der Fläche reflektierte und/oder induzierte Licht wird hierbei mit einem Detektor detektiert. Die axiale Positionierung des Objekts samt Objektträger-einheit könnte kontinuierlich oder schrittweise erfolgen. Zur praktischen Durchführung der Signaldetektion wird zu Beginn das Objekt samt Objektträger-einheit derart positioniert, dass die Fläche der Objektträger-einheit im Fokusbereich des Objektivs des Interferenzmikroskops lokalisiert ist. Hierdurch ist im Allgemeinen ein Signal von dem an der Fläche reflektierten und/oder induzierten Licht detektierbar.

[0026] Insbesondere ist vorgesehen, mehrere axiale Intensitätsverläufe zu detektieren, und zwar an einem und/oder an mehreren Punkten der Fokalebene. Bei einem doppelkonfokalen Rastermikroskop bzw. 4-Pi-Mikroskop könnten die unterschiedlichen Punkte, bei denen jeweils ein oder mehrere Intensitätssignalverläufe zu detektieren sind, durch eine Strahlrasterung angefahren werden. Hierdurch könnte auch in vorteilhafter Weise sichergestellt werden, dass für mehrere Punkte der Fokalebene eine definierte Phasenbeziehung besteht, so dass das Objekt mit dem Strahlrasterverfahren beleuchtet bzw. detektiert werden kann, wobei für unterschiedliche Strahlablenkwinkel bzw. Scanwinkel die gleiche definierte Phasenbeziehung vorliegt. Der wesentliche Vorteil des Strahlrasterverfahrens liegt in der schnellen Objektdetektion. Eine Alternative zu dem Strahlrasterverfahren wäre ein Objekttrasterverfahren, bei dem das Objekt beispielsweise mäanderförmig durch den Fokus des ortsfesten Beleuchtungsstrahls bewegt wird.

[0027] Insbesondere im Hinblick auf eine Veränderung des Zustands des Interferenzmikroskops ist vorgesehen, dass mehrere Detektionen axialer Intensitätssignalverläufe durchgeführt werden, um beispielsweise zu unterschiedlichen Zeiten den Beleuchtungszustand im Objektbereich des Interferenzmikroskops zu bestimmen. In bevorzugter Weise ist vorgesehen, dass Detektionen des Intensitätssignalverlaufs auch während einer Objektdetektion erfolgt. Falls Licht unterschiedlicher Wellenlängen zur Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereichs des Interferenzmikroskops verwendet wird, ist vorgesehen, dass für das Licht jeder Wellenlänge jeweils eine Detektion eines axialen Intensitätssignalverlaufs erfolgt. Dementsprechend würde das an der Fläche reflektierte/induzierte Licht unterschiedlicher Wellenlänge jeweils einem Detektor zugeordnet und von diesem detektiert werden. In diesem Fall wäre eine simultane Detektion des Lichts der unterschiedlichen Wellenlängen möglich. Es wäre auch denkbar, das Licht unterschiedlicher Wellenlängen jeweils ein und demselben Detektor zuzuleiten, wobei in diesem Fall lediglich eine sequentielle Detektion des Lichts der einzelnen Wellenlängen möglich ist.

[0028] In einem weiteren Verfahrensschritt ist vorgesehen, dass der detektierte axiale Intensitätssignalverlauf mit einem Algorithmus ausgewertet wird. Dieser Algorithmus dient in erster Linie zur Bestimmung der im Objektbereich des Interferenzmikroskops vorliegenden Phasenbeziehung

des Beleuchtungs- bzw. Detektionslichts.

[0029] Im Konkreten ist vorgesehen, dass der Algorithmus zunächst den Schwerpunkt des axialen Intensitätssignalverlaufs bestimmt. Des weiteren wird die Höhe des Signals im Schwerpunkt des Intensitätssignalverlaufs bestimmt.

[0030] Zusätzlich oder alternativ könnte der Algorithmus auch die Signalpunkte zweier vom Schwerpunkt des Intensitätssignalverlaufs gleich weit entfernter Punkte vergleichen. Die vom Schwerpunkt gleich weit entfernten Punkte könnten beispielsweise an der Stelle erfolgen, an der bei der 4-Pi-Mikroskopie üblicherweise die Nebenmaxima oder die beiden ersten Minima angeordnet sind. Weiterhin könnte vorgesehen sein, dass der Algorithmus die Symmetrie des Intensitätssignalverlaufs bezüglich dessen Schwerpunkt analysiert.

[0031] Schließlich ist vorgesehen, dass das Interferenzmikroskop in Abhängigkeit von dem Beleuchtungszustand im Objektbereich justiert wird. Die Justage des Interferenzmikroskops erfolgt mit dem Ziel, im Beleuchtungsfokus konstruktive Interferenz zu realisieren. Hierzu könnte eine entsprechende Regelung vorgesehen sein. Im Konkreten könnte die Justage eine optische Weglängenänderung eines Interferometerstrahlengangs umfassen. Diese könnte beispielsweise durch eine Parallelverschiebung eines entsprechenden Spiegels realisiert werden.

[0032] Die beschriebenen Detektions- und Justiervorgänge werden wiederholt und auf das Driftverhalten des Interferenzmikroskops abgestimmt. Unterliegt beispielsweise das Interferenzmikroskop einer relativ hohen Temperaturschwankung, so wird eine häufige Wiederholung der Detektions- und Justiervorgänge erforderlich sein, um nämlich den Beleuchtungszustand im Beleuchtungsfokus derart zu regeln, dass nahezu ausschließlich konstruktive Interferenz vorliegt.

[0033] Es gibt nun verschiedene Möglichkeiten, die Lehre der vorliegenden Erfindung in vorteilhafter Weise auszugestalten und weiterzubilden. Dazu ist einerseits auf die den Patentansprüchen 1 und 28 nachgeordneten Patentansprüche und andererseits auf die nachfolgende Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung zu verweisen. In Verbindung mit der Erläuterung der bevorzugten Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung werden auch im Allgemeinen bevorzugte Ausgestaltungen und Weiterbildungen der Lehre erläutert. In der Zeichnung zeigen

[0034] Fig. 1 eine schematische Darstellung eines 4-Pi-Mikroskops,

[0035] Fig. 2 eine schematische Darstellung eines Teils des optischen Strahlengangs des 4-Pi-Mikroskops aus Fig. 1,

[0036] Fig. 3a ein schematisches Diagramm eines axialen Intensitätssignalverlaufs bei einem herkömmlichen konfokalen Rastermikroskop,

[0037] Fig. 3b ein schematisches Diagramm eines axialen Intensitätssignalverlaufs eines 4-Pi-Mikroskops im Fall konstruktiver Interferenz,

[0038] Fig. 3c ein schematisches Diagramm eines axialen Intensitätssignalverlaufs eines 4-Pi-Mikroskops bei destruktiver Interferenz,

[0039] Fig. 4 eine schematische Darstellung des Bereichs zwischen den beiden Objektiven der Fig. 2,

[0040] Fig. 5 ein Diagramm, in dem der gemessene axiale Intensitätssignalverlauf als Funktion der Position einer beschichteten Oberfläche entlang der optischen Achse aufgetragen ist, wobei hier konstruktive Interferenz vorliegt und

[0041] Fig. 6 ein Diagramm, in dem der gemessene axiale Intensitätssignalverlauf als Funktion der Position der be-

schichteten Oberfläche entlang der optischen Achse aufgetragen ist, wobei hier destruktive Interferenz vorliegt.

[0042] Fig. 1 zeigt ein Interferenzmikroskop, das als 4-Pi-Mikroskop ausgeführt ist. Das Licht der Lichtquelle 10 passiert die Anregungslochblende 11 und wird von dem dichroitischen Strahlteiler 12 in Richtung der Strahlablenkvorrichtung 13 abgelenkt. Die Strahlablenkvorrichtung 13 scannt bzw. lenkt den Lichtstrahl in zwei im wesentlichen senkrecht zueinander stehenden Richtungen ab, so dass letztendlich der Beleuchtungsfokus im Objektbereich durch die Scanbewegung der Strahlablenkvorrichtung 13 beispielsweise mäanderförmig einen zweidimensionalen Bereich der Fokalebene abscannt bzw. abrastert. Das in Fig. 1 lediglich schematisch dargestellte Interferenzmodul 14 ist in Fig. 2 gezeigt. Hierbei ist mit 8 die Schnittstelle zum Mikroskop angedeutet, die gleichzeitig eine korrespondierende Ebene zur Eintrittspupillenebene des Objektivs des Interferenzmoduls 14 darstellt. Mit den durchgezogenen Linien 1 ist ein nicht abgelenkter bzw. nicht gescannter, aufgeweiteter Lichtstrahl angedeutet. Mit dem gestrichelt eingezeichneten Lichtstrahl 2 ist ein abgelenkter Strahlverlauf gezeigt, wie er von der Strahlablenkvorrichtung 13 hervorgerufen wurde. Die Lichtstrahlen 1 bzw. 2 werden vom Spiegel 3 in Richtung des Strahlteilerwürfels 5 reflektiert. Der Strahlteilerwürfel 5 teilt das Beleuchtungslicht in zwei Teilstrahlen auf, die jeweils von dem Spiegel 3 in Richtung der Objektive 6 reflektiert werden. Die beiden Objektive 6 sind beidseits der Objektebene 26 angeordnet und gegeneinander gerichtet. Lediglich schematisch sind die Eintrittspupillen 7 der Objektive 6 eingezeichnet. Dem schematisch angedeuteten Fokusbereich in der Objektebene 26 kann entnommen werden, dass durch die Strahlablenkung der mit durchgezogenen Linien dargestellte Lichtstrahl 1 eine andere Lateralposition der Objektebene 26 beleuchtet, als dies der gestrichelt eingezeichnete Lichtstrahl 2 tut. Die Linsen 4 dienen zur Pupillenverlagerung der Eintrittspupillen 7 der Objektive 6, die in dem Interferenzmodul 14 weiter von der korrespondierenden Ebene zur Eintrittspupillenebene des Objektivs 8 entfernt sind, als dies bei einem konventionellen Mikroskop der Fall wäre. Die Pupillenverlagerung in Fig. 2 wird durch eine reale Zwischenabbildung realisiert. Der in Fig. 2 gezeigte Strahlengang samt optischer Komponenten ist in einem an ein konventionelles Mikroskop adaptierbaren Modul angeordnet.

[0043] Das vom Objekt reflektierte bzw. emittierte Fluoreszenzlicht, das von den Objektiven aufgesammelt wird, durchläuft den Beleuchtungsstrahlengang in umgekehrter Richtung. So wird das die beiden Interferometerstrahlengänge 27, 28 durchlaufende Licht am Strahlteiler 5 vereinigt und nach der Reflexion am Spiegel 3 in Richtung der Schnittstelle 8 zum Mikroskop reflektiert. In dem hier konkret vorliegenden Fall durchläuft das vom Objekt emittierte Fluoreszenzlicht die Strahlablenkvorrichtung 13 ebenfalls in umgekehrter Richtung und passiert aufgrund seiner Wellenlängeneigenschaften den dichroitischen Strahlteiler 12. Lediglich Fluoreszenzlicht aus dem Fokusbereich der beiden Objektive 6 kann aufgrund der konfokalen Anordnung die Detektionslochblende 15 passieren. Die der Detektionslochblende 15 nachgeordneten dichroitischen Strahlteiler 17 führen das Fluoreszenzlicht der unterschiedlichen Fluorochrome, mit denen das Objekt spezifisch markiert ist, den drei Detektoren 16 zu, die jeweils Fluoreszenzlicht eines bestimmten Emissionswellenlängenbereichs detektieren.

[0044] Fig. 3a zeigt einen Intensitätssignalverlauf eines konventionellen konfokalen Rastermikroskops in Abhängigkeit der Z-Koordinate bzw. axialen Richtung entlang der optischen Achse. Ein solcher Intensitätssignalverlauf kann beispielsweise mit einem in der Objektebene 26 eingebrach-



ten Fluoreszenzschicht detektiert werden, wenn lediglich der Interferometerteilstrahlengang 28 zur Beleuchtung und zur Detektion genutzt wird. Fig. 3b zeigt einen axialen Intensitätssignalverlauf als Funktion der Z-Koordinate bzw. axialen Richtung eines doppelkonfokalen Rastermikroskops bzw. eines 4-Pi-Mikroskops. An der strichpunktiert dargestellten Fokusposition der beiden Objektive 6 weist der axiale Intensitätsverlauf der Fig. 3b ein Hauptmaximum auf. Durch die Ausbildung eines Beleuchtungsinterferenzmusters des Interferenzmoduls 14 treten neben dem Hauptmaximum jeweils um ca.  $\lambda/2$  axial in beide Richtungen versetzt zwei Nebenmaxima mit geringerer Intensität auf. Bei dem in Fig. 3b gezeigten axialen Intensitätssignalverlauf handelt es sich um einen Signalverlauf, der bei Vorliegen konstruktiver Interferenz gegeben ist. In diesem Fall ist die Phasenbeziehung des die beiden Interferometerteilstrahlengänge 27, 28 durchlaufenden Beleuchtungslichts entsprechend ausgebildet, so dass sich genau in der Objektebene 26 die beiden fokussierten Teilstrahlen verstärken.

[0045] Fig. 3c zeigt ebenfalls einen axialen Intensitätssignalverlauf in Abhängigkeit der Z-Koordinate bzw. axialen Richtung, bei dem destruktive Interferenz vorliegt. Somit ist die Phasenbeziehung des die beiden Interferometerteilstrahlengänge 27, 28 durchlaufenden Beleuchtungslichts derart ausgebildet, dass sich deren Amplituden in der Objektebene gerade auslöschen, so dass sich an der strichpunktierten Z-Position ein Minimum ausbildet.

[0046] Fig. 4 zeigt den Bereich zwischen den beiden Objektiven 6 vergrößert. Fig. 4 kann entnommen werden, dass das zu untersuchende Objekt in einem Bereich zwischen zwei als Deckgläser ausgeführten Objektträgereinheiten 22 angeordnet ist, die den Objektbereich 23 begrenzen. Zwischen den Deckgläsern 22 und dem Objektiv 6 befindet sich jeweils Immersionsmedium 24.

[0047] Erfindungsgemäß ist zur Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereich 23 des Interferenzmikroskops mindestens eine Oberfläche 29 eines Deckglases 22 lichtmikroskopisch detektierbar ausgestaltet. Hierbei wird das an Oberfläche 29 reflektierte/induzierte Licht von dem Detektor 16 detektiert.

[0048] Die Oberfläche 29 ist teilweise reflektierend ausgeführt. Hierzu ist die Oberfläche mit einer metallischen Beschichtung 25 versehen und weist einen konstanten Reflexionsgrad auf. Auf der metallischen Beschichtung 25 sind zwei zur Fluoreszenz anregbare Schichten aufgebracht (nicht eingezeichnet), die jeweils in Form einer Monolayer-Schicht ausgeführt sind. Die beiden Fluoreszenz-Monolayer-Schichten weisen unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften auf. Die beiden Fluoreszenzschichten werden jeweils mit Licht der Lichtquelle 10 zur Fluoreszenz angeregt. Das an der Oberfläche reflektierte und induzierte Licht wird mit den Detektoren 16 des Interferenzmikroskops detektiert. Bei dieser Detektion handelt es sich um eine konfokale Detektion, wobei den Detektoren 16 die Detektionslochblende 15 vorgeordnet ist. Die Detektionslochblende 15 ist in einer zur Objektebene 26 der Objektive 6 korrespondierenden Ebene angeordnet. Bei den beiden Objektträgereinheiten 22 handelt es sich um Deckgläser, von denen lediglich eines eine Beschichtung 25 aufweist. Diese Beschichtung ist auf der dem Objekt zugewandten Oberfläche des Deckglases aufgebracht.

[0049] In verfahrensmäßiger Hinsicht wird die Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereich 23 des Interferenzmikroskops anhand des an der Oberfläche 29 reflektierten und induzierten Lichts durchgeführt, indem ein Intensitätssignalverlauf in Abhängigkeit der axialen Position der Oberfläche 29 gemessen wird. Hierzu wird das Objekt samt den Deckgläsern 22 entlang der optischen Achse

der Objektive 6 bewegt, und das an der Oberfläche 29 reflektierte und induzierte Licht wird von den Detektoren 16 detektiert.

[0050] Der axiale Intensitätssignalverlauf wird derart detektiert, dass zunächst das Objekt samt Deckgläsern 22 derart positioniert wird, dass die Oberfläche 29 des einen Deckglases 22 im Fokusbereich der Objektive 6 lokalisiert ist. Es ist vorgesehen, dass mehrere axiale Intensitätssignalverläufe an mehreren Punkten in der Fokalebene bzw. Objektebene 26 detektiert werden. Die unterschiedlichen Punkte der Fokalebene werden durch eine Strahlablenkung, die von der Strahlablenkvorrichtung 13 herbeigeführt wird, angefahren (siehe Fig. 2).

[0051] Da die Oberfläche 29 des Deckglases 22 mit einer teilweise reflektierenden und zwei unterschiedlichen Fluoreszenzschichten beschichtet ist, werden mit den Detektoren 16 simultan jeweils eine Detektion eines axialen Intensitätssignalverlaufs durchgeführt. So wird das an der teilweise reflektierenden Beschichtung 25 reflektierte Beleuchtungslicht dem ersten Detektor 16 zugeleitet, das Fluoreszenzlicht der ersten Fluoreszenzschicht dem zweiten Detektor 16 und das Fluoreszenzlicht der zweiten Fluoreszenzschicht dem dritten Detektor 16. Das zur Beleuchtung bzw. Anregung der Fluoreszenzschichten dienende Licht der Lichtquelle 10 umfasst Licht der Wellenlängen 488 nm und 647 nm. Demgemäß detektiert der erste Detektor 16 das an der reflektierenden Beschichtung 25 reflektierte Licht der Wellenlänge 488 nm. Das Beleuchtungslicht mit der Wellenlänge 488 nm regt die erste Fluoreszenzschicht zur Fluoreszenz an, das Beleuchtungslicht mit der Wellenlänge 647 nm regt die zweite Fluoreszenzschicht zur Fluoreszenz an.

[0052] Fig. 5 zeigt in einem Diagramm einen gemessenen axialen Intensitätssignalverlauf des ersten Detektors 16; der das an der reflektierenden Beschichtung 25 reflektierte Licht der Wellenlänge 488 nm detektiert. Der axiale Intensitätssignalverlauf ist in Abhängigkeit der Z-Koordinate bzw. der optischen Achse dargestellt und in Einheiten der verwendeten Wellenlänge aufgetragen. Die Z-Koordinate 0 entspricht hierbei der Objektebene 26. Der in Fig. 5 angezeigte gemessene Intensitätssignalverlauf entspricht konstruktiver Interferenz, d. h. in der Objektebene 26 addieren sich die Amplituden des die Interferometerteilstrahlengänge 27, 28 durchlaufenden Beleuchtungslichts konstruktiv zu einem Maximum. Dies könnte genau dann der Fall sein, wenn die optischen Weglängen der Interferometerteilstrahlengänge 27, 28 exakt gleich lang sind. Dies könnte auch der Fall sein, wenn die optischen Weglängenunterschiede der beiden Interferometerteilstrahlengänge 27, 28 sich um das Vielfache von  $\lambda/2$  unterscheiden. Der in Fig. 5 gezeigte gemessene axiale Intensitätssignalverlauf repräsentiert das vom Detektor 16 detektierte, an der reflektierenden Beschichtung 25 reflektierte Licht, das sich aus einem reflektierten und einem transmittierten Anteil zusammensetzt, die sich in der Detektion addieren. Der Reflexionsgrad der Beschichtung 25 ist hierbei 0,05. Da es sich bei dem in Fig. 5 gezeigten axialen Intensitätssignalverlauf um reflektiertes Licht handelt, erfährt dieses einen doppelten Weglängenunterschied, da das Licht reflexionsbedingt den doppelten Weg zurücklegt. Bei einem geometrischen Weglängenunterschied eines Interferometerteilstrahlengangs gegenüber dem anderen von 212 tritt daher – wie in Fig. 5 gezeigt – konstruktive Interferenz auf. Beträgt der geometrische Weglängenunterschied zwischen den beiden Interferometerteilstrahlengängen 27, 28 lediglich 214, so tritt – wie in Fig. 6 gezeigt – destruktive Interferenz am Detektor auf. Dagegen wird bei Fluoreszenzanregung einer Fluoreszenzschicht eine destruktive Interferenz bei einer optischen Weglängendifferenz der beiden Interferometerteilstrahlengänge 27, 28 bei  $\lambda/2$  erreicht.

[0053] In besonders vorteilhafter Weise werden die gemessenen axialen Intensitätssignalverläufe des reflektierten sowie der beiden unterschiedlichen Fluoreszenzschichten simultan gemessen und in die Auswertung mit einbezogen. Da die gemessenen Signale von Licht unterschiedlicher Wellenlängen stammen, kann hierdurch sogar in besonders vorteilhafter Weise eine absolute Abgleichung der optischen Weglängen der beiden Interferometerstrahlengänge 27, 28 durchgeführt werden, denn nur bei einem absoluten Weglängenunterschied von 0 interferiert das Licht der unterschiedlichen Wellenlängen gleichermaßen konstruktiv, vorausgesetzt, dass die Wellenlängen nicht rationalzahlige Vielfache voneinander sind. In diesem Fall wäre ein 4-Pi-Mikroskop vom Typ C realisiert, bei dem nämlich eine konstruktive Interferenz des Beleuchtungslichts sowie eine konstruktive Interferenz des Detektionslichts vorliegt, wodurch das axiale Auflösungsvermögen optimiert ist.

[0054] Die axialen Intensitätssignalverläufe werden mit einem Algorithmus ausgewertet. Dieser Algorithmus bestimmt zum einen die Höhe des Signals im Schwerpunkt des Intensitätssignalverlaufs, der bei den gemessenen Intensitätssignalverläufen der Fig. 5 und 6 an der Axialposition 0 vorliegt. Des weiteren vergleicht der Algorithmus die Signalthöhe zweier vom Schwerpunkt des Intensitätssignalverlaufs gleich weit entfernten Punkte. Die gleich weit vom Schwerpunkt mit der Z-Koordinate 0 entfernten Punkte sind bei den Z-Koordinaten  $\lambda/2$ ,  $-\lambda/2$  lokalisiert, also genau dort, wo die ersten Nebenmaxima der aus Fig. 3b gezeigten konstruktiven Interferenzerscheinungen auftreten sollten.

[0055] Das Interferenzmikroskop wird in Abhängigkeit von dem Beleuchtungszustand im Objektbereich justiert. Hierzu ist eine Regelung vorgesehen, die während des Messvorgangs der axialen Intensitätssignalverläufe die optische Weglänge des Interferometerstrahlengangs 27 derart verändert, dass die gemessenen axialen Intensitätssignalverläufe einen für konstruktive Interferenz typischen Signalverlauf, beispielsweise gemäß Fig. 5, aufweist. Diese Detektions- und Justiervorgänge werden wiederholt durchgeführt und sind auf das Driftverhalten des Interferenzmoduls 14 abgestimmt.

[0056] Abschließend sei ganz besonders darauf hingewiesen, dass die voranstehend erörterten Ausführungsbeispiele lediglich zur Beschreibung der beanspruchten Lehre dienen, diese jedoch nicht auf die Ausführungsbeispiele einschränken.

#### Bezugszeichenliste

1 Lichtstrahl	50
2 von (13) abgelenkter Lichtstrahl	
3 Spiegel	
4 Linse	
5 Strahlteilerwürfel	
6 Objektiv	55
7 Eintrittspupille von (6)	
8 Schnittstelle zum Mikroskop	
10 Laser	
11 Beleuchtungslochblende	
12 dichroitischer Strahlteiler	60
13 Strahlablenkvorrichtung	
14 Interferenzmodul	
15 Detektionslochblende	
16 Detektor	
17 dichroitischer Strahlteiler	65
22 als Deckglas ausgebildete Objektträgerereinheit	
23 Objektbereich	
24 Immersionsmedium	

- 25 Beschichtung von (22)
- 26 Objektebene
- 27 Interferometerstrahlengang
- 28 Interferometerstrahlengang
- 29 Oberfläche von (22)

#### Patentansprüche

1. Interferenzmikroskop, insbesondere ein 4Pi-, Wellenfeld-, I<sup>2</sup>M-, I<sup>3</sup>M- oder I<sup>5</sup>M-Mikroskop, wobei mindestens eine dem Objekt zugeordnete Objektträgerereinheit (22) vorgesehen ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass zur Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereich des Interferenzmikroskops mindestens eine Fläche (29) – vorzugsweise eine Oberfläche (29) – der Objektträgerereinheit (22) lichtmikroskopisch detektierbar ausgestaltet ist.
2. Interferenzmikroskop nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass an der Fläche Licht reflektierbar und/oder induzierbar ist und dass dieses Licht von einem Detektor (16) detektierbar ist.
3. Interferenzmikroskop nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Fläche, vorzugsweise die Oberfläche (29), zumindest teilweise reflektierend ausgeführt ist.
4. Interferenzmikroskop nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche (29) beschichtet ist.
5. Interferenzmikroskop nach Anspruch 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche (29) einen definierten Reflexionsgrad aufweist, der vorzugsweise konstant ist.
6. Interferenzmikroskop nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Beschichtung (25) der Oberfläche (29) wellenlängenabhängig ausgeführt ist, so dass Licht mindestens einer Wellenlänge reflektierbar ist.
7. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine metallische oder dielektrische Beschichtung (25) vorgesehen ist.
8. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass eine dielektrische oder metallisch-dielektrische Hybridbeschichtung vorgesehen ist.
9. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens eine Oberfläche (29) der Objektträgerereinheit (22) mindestens eine zur Lumineszenz, insbesondere Fluoreszenz, anregbare Schicht aufweist.
10. Interferenzmikroskop nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass die zur Lumineszenz anregbare Schicht eine Monolayer-Schicht ist.
11. Interferenzmikroskop nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberfläche (29) mehrere, in ihren Lumineszenzeigenschaften unterschiedliche Lumineszenzschichten aufweist.
12. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die Lumineszenzschicht mit Licht einer Lichtquelle (10) zur Lumineszenz anregbar ist.
13. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass an einer Fläche (29) der Objektträgerereinheit (22) Licht mit Hilfe nicht-linearer Prozesse induzierbar ist.
14. Interferenzmikroskop nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass der nichtlineare Prozess CARS (Coherent-Anti-Stokes-Raman-Scattering) ist.
15. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1



bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das an der Fläche (29) reflektierte und/oder induzierte Licht mit dem Detektor (16) des Interferenzmikroskops detektierbar ist.

16. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass das an der Fläche (29) reflektierte und/oder induzierte Licht mit einem zusätzlichen Detektor detektierbar ist.

17. Interferenzmikroskop nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass das an der Fläche (29) reflektierte und/oder induzierte Licht mit Hilfe eines optischen Bauteils aus dem Detektions- oder Beleuchtungsstrahlengang des Interferenzmikroskops ausblendbar und dem zusätzlichen Detektor zuführbar ist.

18. Interferenzmikroskop nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass als optisches Bauteil eine Glasplatte, ein dichroitischer Strahlteiler, ein Filter, ein Prisma, ein Gitter und/oder eine spektral empfindliche Anordnung vorgesehen ist.

19. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das an der Fläche (29) der Objektträgerereinheit (22) reflektierte und/oder induzierte Licht im Widefield-Modus detektierbar ist.

20. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 15 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass das an der Fläche (29) der Objektträgerereinheit (22) reflektierte und/oder induzierte Licht konfokal detektierbar ist.

21. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 15 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass dem Detektor (16) eine Lochblende (15) vorgeordnet ist.

22. Interferenzmikroskop nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Lochblende (15) in einer zur Objektebene (26) eines Objektivs (6) korrespondierenden Ebene angeordnet ist.

23. Interferenzmikroskop nach Anspruch 21 oder 22, dadurch gekennzeichnet, dass als Lochblende (15) die Beleuchtungs- oder Detektionslochblende (15) des Interferenzmikroskops vorgesehen ist.

24. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereich des Interferenzmikroskops mit Licht mindestens einer zusätzlichen Lichtquelle durchführbar ist, vorzugsweise mit einem Laser.

25. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Objektträgerereinheit (22) aus Glas angefertigt ist.

26. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Objektträgerereinheit (22) als Deckglas ausgeführt ist.

27. Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass das Objekt zwischen zwei Objektträgerereinheiten (22) angeordnet ist.

28. Verfahren zum Betreiben eines Interferenzmikroskops, insbesondere eines 4Pi-, Wellenfeld-, I<sup>2</sup>M-, I<sup>3</sup>M- oder I<sup>4</sup>M-Mikroskops, vorzugsweise mit einem Interferenzmikroskop nach einem der Ansprüche 1 bis 27, wobei mindestens eine dem Objekt zugeordnete Objektträgerereinheit (22) vorgesehen ist, dadurch gekennzeichnet, dass der Beleuchtungszustand im Objektbereich des Interferenzmikroskops anhand mindestens einer lichtmikroskopisch detektierbar ausgestalteten Fläche – vorzugsweise eine Oberfläche (29) – der Objektträgerereinheit (22) bestimmt wird.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des Beleuchtungszustands im Objektbereich des Interferenzmikroskops anhand des an der Fläche (29) reflektierten und/oder in-

duzierten Lichts erfolgt, indem ein Intensitätssignalverlauf in Abhängigkeit der axialen Position der Fläche (29) detektiert wird.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass zur Detektion des axialen Intensitätssignalverlaufs das Objekt samt Objektträgerereinheit (22) entlang der optischen Achse des Objektivs bzw. der Objektive (6) bewegt wird und dass hierbei das von der Fläche (29) reflektierte und/oder induzierte Licht detektiert wird.

31. Verfahren nach Anspruch 29 oder 30, dadurch gekennzeichnet, dass zu Beginn der Detektion des Intensitätssignalverlaufs das Objekt samt Objektträgerereinheit (22) derart positioniert wird, dass die Fläche (29) der Objektträgerereinheit (22) im Fokusbereich des Objektivs (6) des Interferenzmikroskops lokalisiert ist.

32. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass an einem und/oder an mehreren Punkten der Fokalebene mehrere axiale Intensitätssignalverläufe detektiert werden.

33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass bei einem 4Pi-Mikroskop die unterschiedlichen Punkte der Fokalebene durch eine Strahlrasterung angefahren werden.

34. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass mehrere Detektionen axialer Intensitätssignalverläufe durchgeführt werden, die vorzugsweise auch während einer Objektdetektion erfolgen.

35. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass für Licht unterschiedlicher Wellenlängen jeweils eine Detektion eines axialen Intensitätssignalverlaufs erfolgt.

36. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass der detektierte axiale Intensitätssignalverlauf mit einem Algorithmus ausgewertet wird.

37. Verfahren nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass der Algorithmus die Höhe des Signals im Schwerpunkt des Intensitätssignalverlaufs bestimmt.

38. Verfahren nach Anspruch 36 oder 37, dadurch gekennzeichnet, dass der Algorithmus die Signalthöhe zweier vom Schwerpunkt des Intensitätssignalverlaufs gleich weit entfernter Punkte vergleicht.

39. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 38, dadurch gekennzeichnet, dass der Algorithmus die Symmetrie des Intensitätssignalverlaufs bezüglich dessen Schwerpunkt analysiert.

40. Verfahren nach einem der Ansprüche 29 bis 39, dadurch gekennzeichnet, dass das Interferenzmikroskop in Abhängigkeit von dem Beleuchtungszustand im Objektbereich justiert wird.

41. Verfahren nach Anspruch 40, dadurch gekennzeichnet, dass die Justage des Interferenzmikroskops derart erfolgt, dass im Beleuchtungsfokus konstruktive Interferenz vorliegt, vorzugsweise mit einer entsprechenden Regelung.

42. Verfahren nach Anspruch 40 oder 41, dadurch gekennzeichnet, dass die Justage durch eine optische Weglängenänderung eines Interferometerstrahlengangs (27) erfolgt.

43. Verfahren nach einem der Ansprüche 40 bis 42, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektions- und Justiervorgänge wiederholt werden und auf das Driftver-

halten des Interferenzmikroskops abgestimmt sind.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

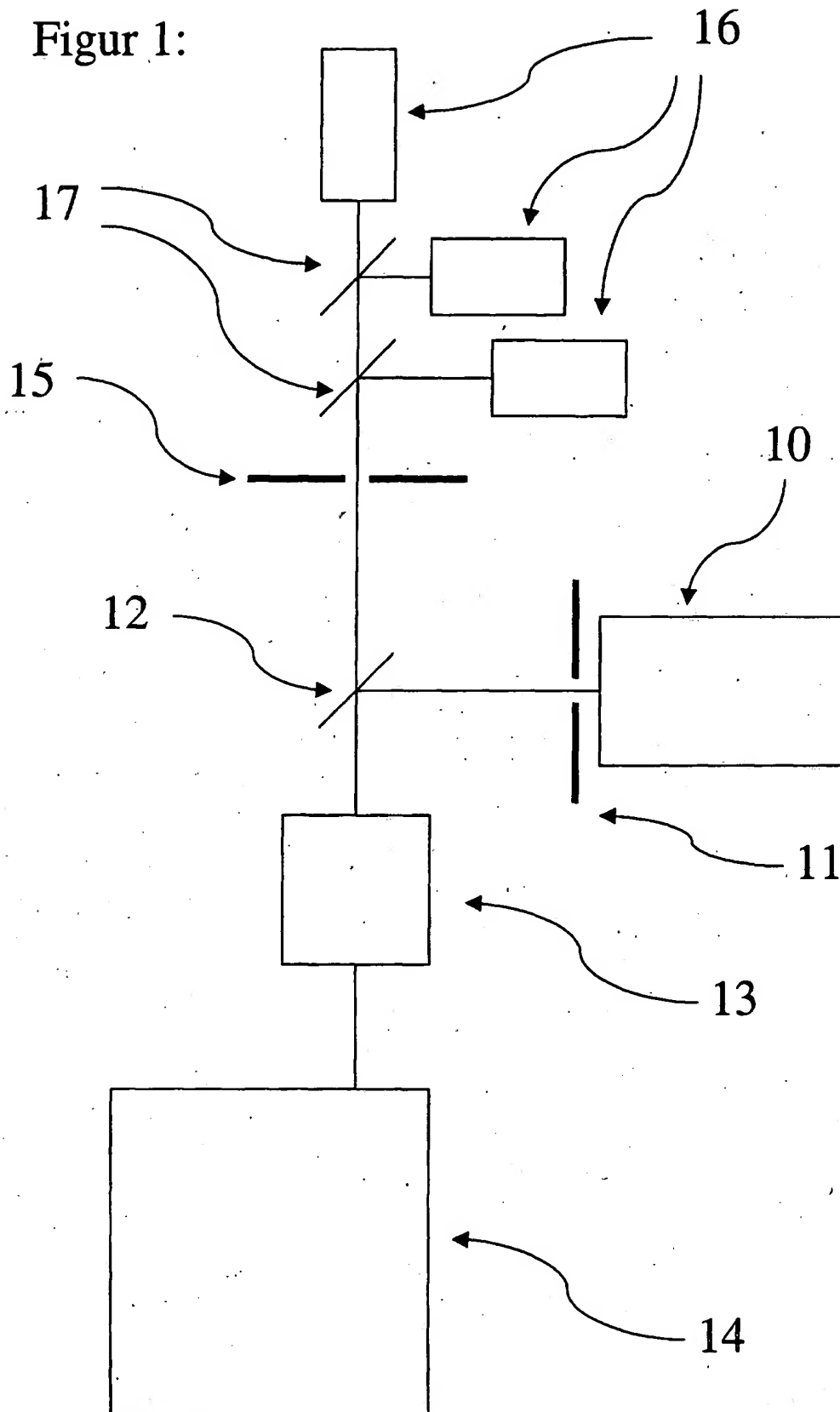
55

60

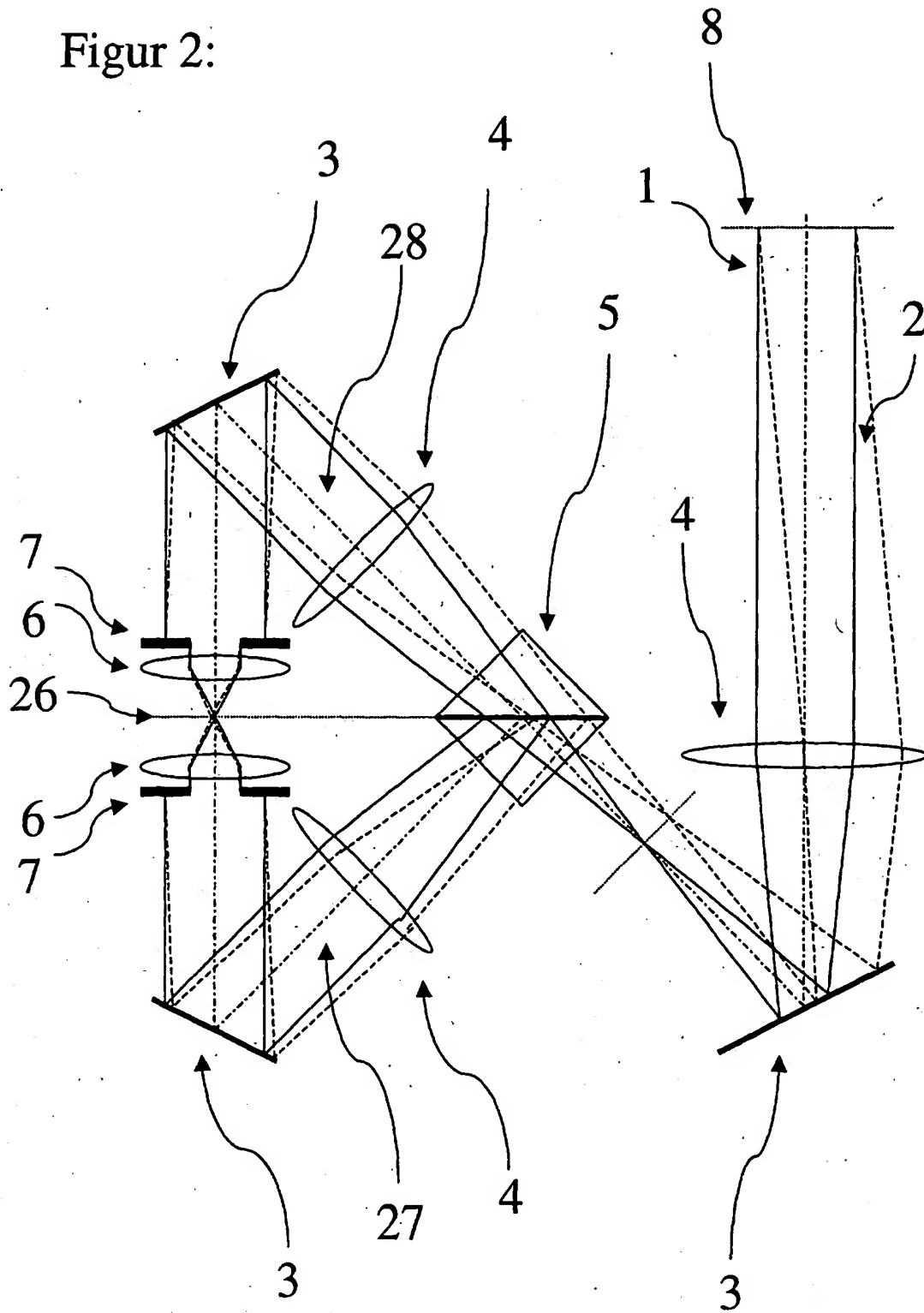
65

- Leerseite -

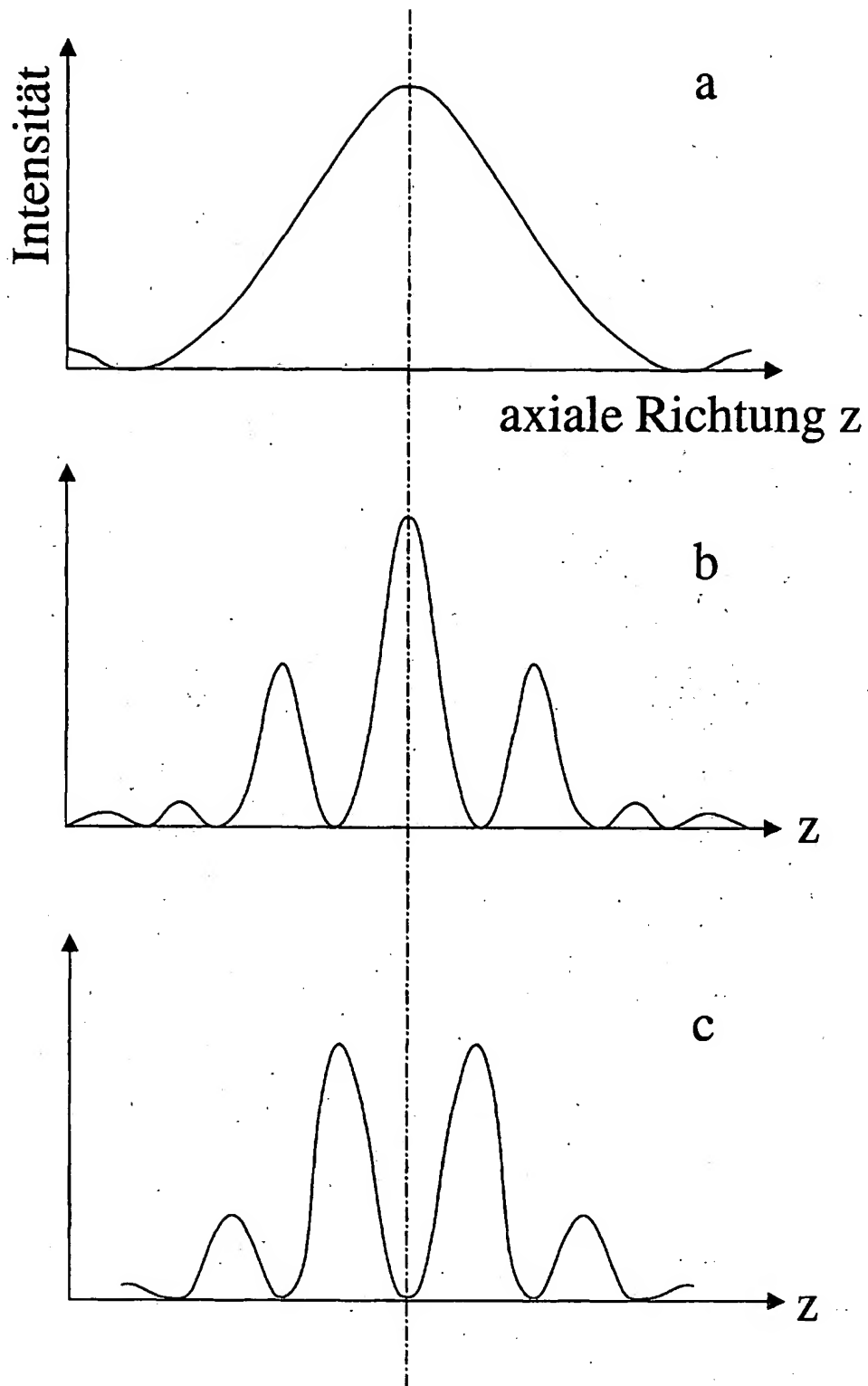
Figur 1:



Figur 2:

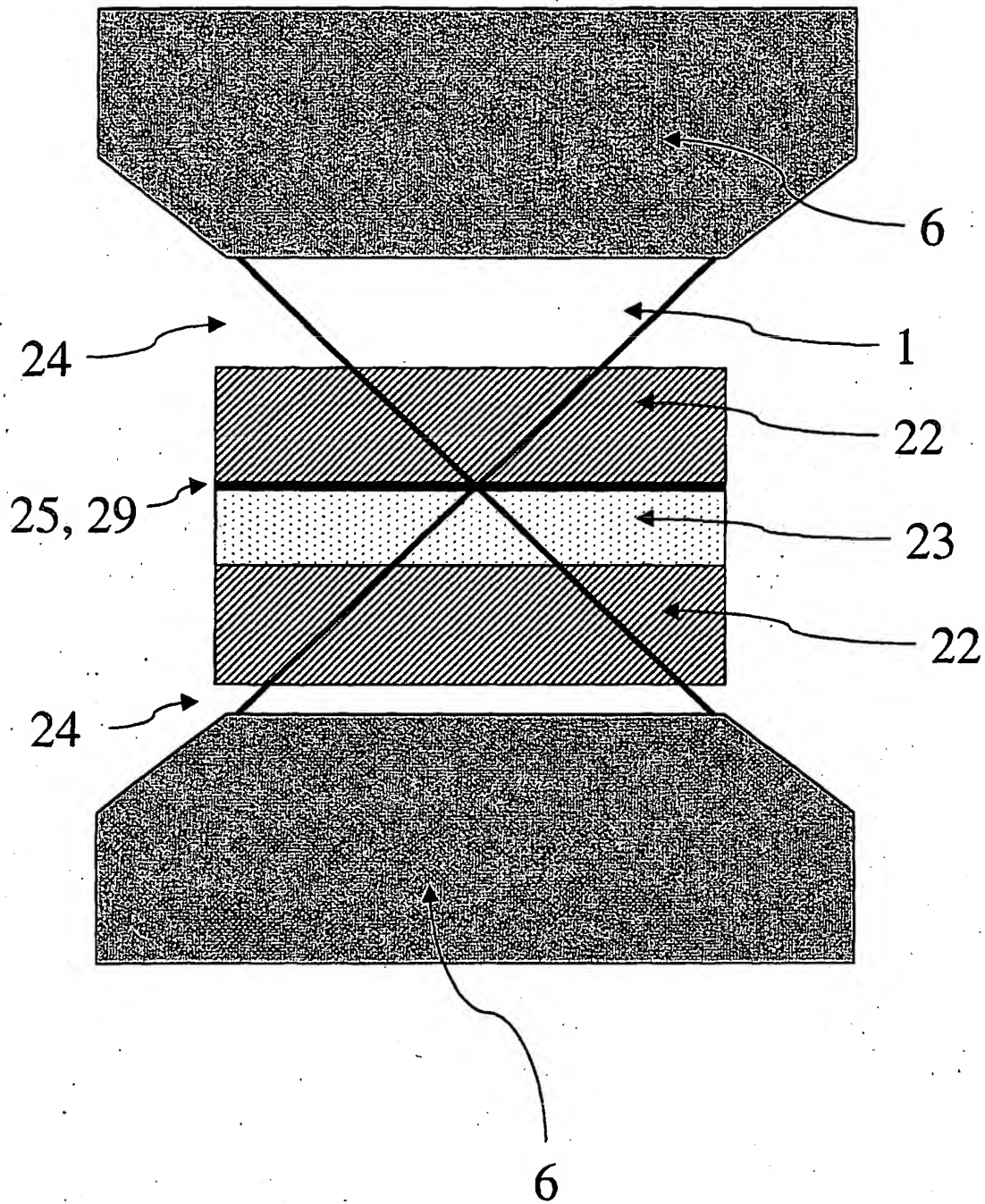


Figur 3:



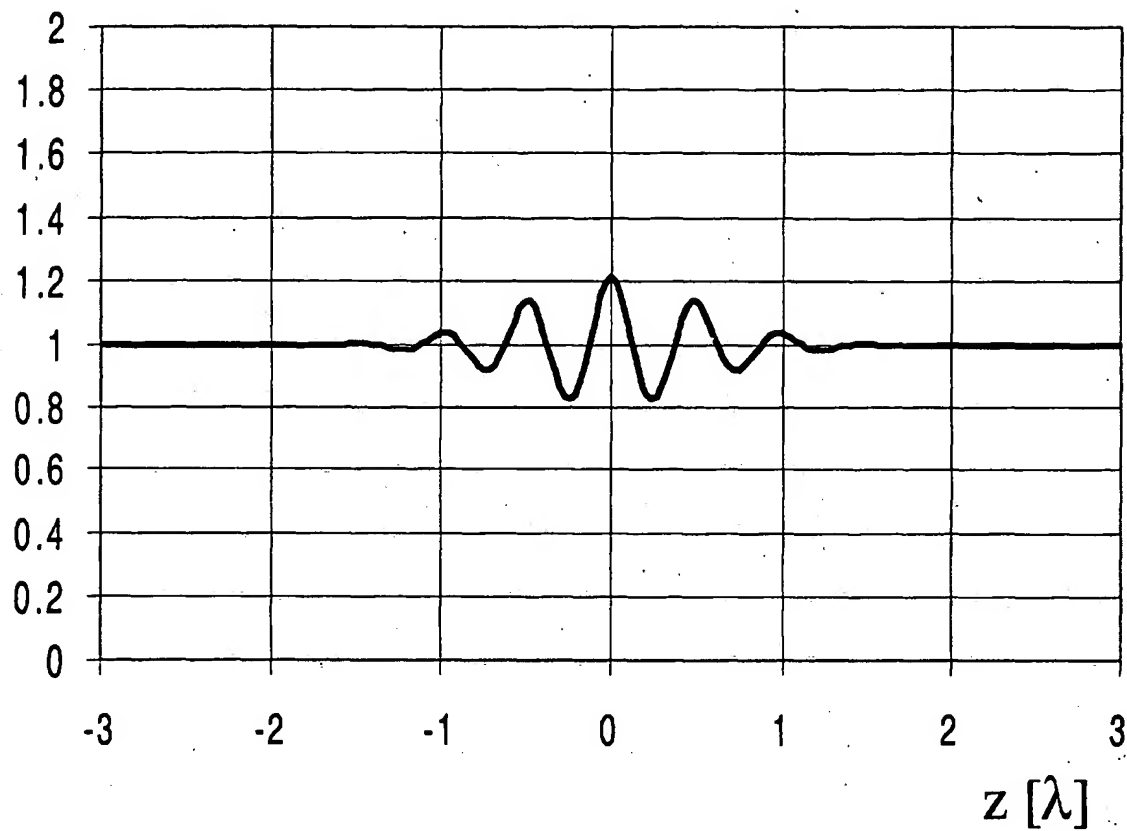


Figur 4:



Figur 5:

Intensität [a.u.]



Figur 6:

Intensität [a.u.]

